



## Coloraciones

Protocolos de las coloraciones más utilizadas en el laboratorio de diagnóstico veterinario.

## CEDIVE

Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias. FCV. UNLP.

## COLORACIÓN DE ZIEHL NEELSEN

Los miembros del género *Mycobacterium* se tiñen muy pobremente con las técnicas normales a causa de la elevada proporción de material lipídico de sus células.

La coloración de Ziehl Neelsen usa colorantes concentrados con el agregado de calor, este procedimiento tiñe las células bacterianas que son resistentes a la decoloración con los ácidos fuertes; luego se hacen actuar colorantes que hacen contraste y que colorean a las bacterias, no ácido alcohol resistentes, que se han decolorado.

### Reactivos:

#### 1. Fucsina fenicada de Ziehl

*Solución A:* 0,3 gramos (en el laboratorio lo preparamos con 1 gramo) de fucsina básica en 10 mL. Alcohol etílico de 95°

*Solución B:* 5 gramos de fenol (o 4,66 mL de fenol fundido) en 95 mL de agua destilada.

Volcar gradualmente la solución A en la B agitando enérgicamente, dejar reposar algunos días.

Filtrar antes de usar.

#### 2. Azul de metileno alcalino de Loeffler (solución saturada)

0,3 gr. de azul de metileno

30 mL de alcohol etílico de 95° (Solución saturada)

0,01 gr. de OHK en 100 mL de agua destilada

Mezclar la solución saturada en esta solución de OHK

Filtrar antes de su empleo

#### 3. Alcohol ácido (decolorante)

CIH concentrado.....3mL.

Alcohol etílico de 95°.....97mL.



## Coloraciones

Protocolos de las coloraciones más utilizadas en el laboratorio de diagnóstico veterinario.

## CEDIVE

Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias. FCV. UNLP.

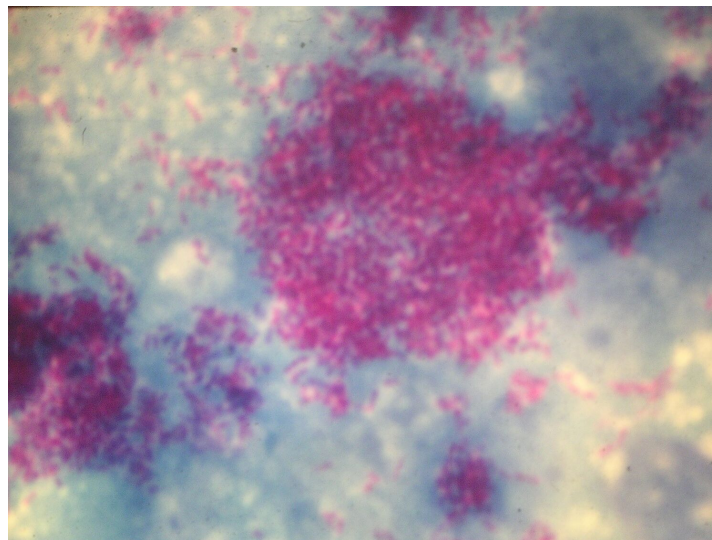
### Técnica:

1. Se cubre el frotis con fucsina de Ziehl y se calienta con el fuego de un hisopo de algodón embebido en alcohol, evitar la evaporación agregando más colorante si fuera necesario, evitar así mismo que el colorante hierva.
2. Se lava con agua corriente.
3. Se decolora con alcohol ácido evitando que queden acúmulos de colorante.
4. Se lava con agua corriente.
5. Se hace una coloración de contraste con azul de metileno durante 1 minuto.
6. Se lava con agua se seca y se observa en inmersión (100X).

### Interpretación (figura1):

Microorganismos ácido alcohol resistentes: Rojos

Microorganismos no ácido alcohol resistentes: Color del contracolorante (en este caso azul)



**Figura 1.** Grupo de bacilos ácido alcohol resistente (BAAR) compatibles con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Micrografía del CEDIVE. FCV. UNLP.

### Coloración de Stamp (Ziehl Neelsen modificada)

Este método es conveniente para tinción de membranas fetales, contenido estomacal de fetos abortados y puede usarse también con frotis de hisopados vaginales tomados pocos días después del aborto.



## Coloraciones

Protocolos de las coloraciones más utilizadas en el laboratorio de diagnóstico veterinario.

## CEDIVE

Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias. FCV. UNLP.

### Reactivos:

Fucsina de Ziehl diluida 1/10

Acido acético al 0,5%

Azul de metileno

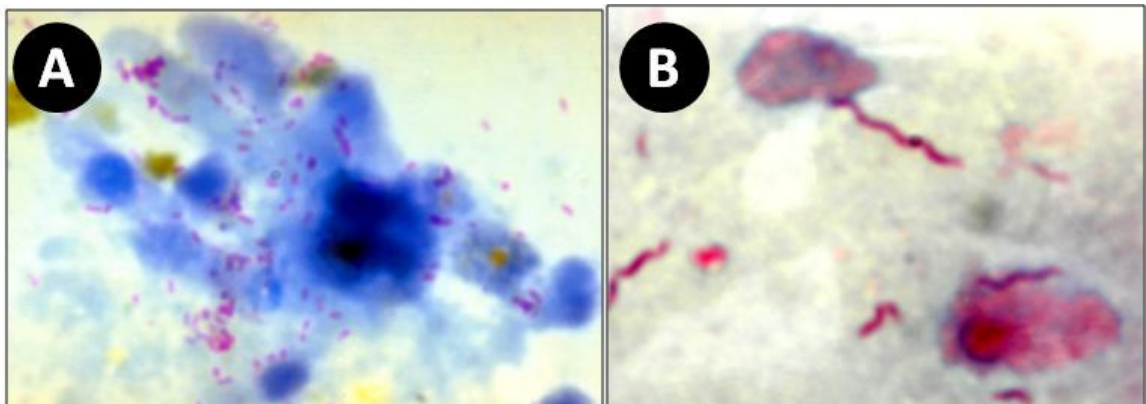
### Técnica:

1. Secar y fijar el frotis sobre la llama
2. Teñir con fucsina diluida 10 minutos
3. Lavar con agua
4. Diferenciar con solución de ácido acético no más de 30 segundos
5. Lavar intensamente
6. Teñir ligeramente con Azul de Metileno al 1 % durante 20 segundos.

### Interpretación (figura 2):

Las brucelas se tiñen de rojo contra un fondo azul. En frotis de membranas fetales a menudo se encuentran los bacilos en acúmulos en las células de los tejidos que se tiñen de azul (figura 2A).

Este método también es útil en el diagnóstico de *Campylobacter fetus* y otras infecciones. Este microorganismo también se tiñe de rojo, pero se diferencia de las brucelas por su morfología (figura 2B).



**Figura 2.** Coloración de Stamp en una vista de 100X. En A se observan coco bacilos de color rojo en el interior y el exterior de células del líquido de abomaso de un feto bovino. En B se evidencian formas bacterianas de color rojo compatibles con campylobacterias. Micrografía del CEDIVE. FCV. UNLP.



### Coloraciones

Protocolos de las coloraciones más utilizadas en el laboratorio de diagnóstico veterinario.

### CEDIVE

Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias. FCV. UNLP.

### Coloración de Azul de Metileno (para observar la cápsula de *Bacillus anthracis*)

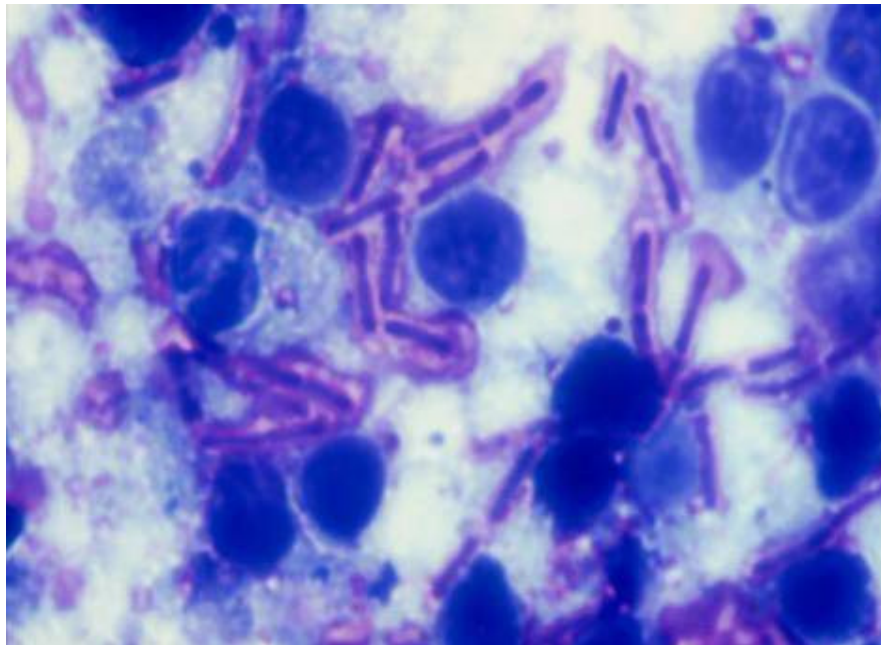
Con este método se pueden colorear muestras de necropsias provenientes del bazo o de médula ósea de animales con sospecha de muerte por carbunco. Además esta coloración permite observar la cápsula que forma el *Bacillus anthracis* luego de sembrar al microorganismo en una agar tripticasa soya con 5% de suero y bicarbonato de sodio al 0,5 % e incubarlo 24 horas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### Técnica:

- Secar y fijar el frotis sobre la llama.
- Teñir con Azul de Metileno al 1 % durante un minuto.

#### Interpretación (figura 3):

Los bacilos se disponen formando largas cadenas ramificadas. El soma bacteriano se tiñe de color azul mientras que las cápsulas se colorean de un color rosado intenso.



**Figura 3.** Coloración de azul de metileno. Impronta de un bazo bovino en donde se pueden observar bacilos en cadenas con cápsula de color rosado, compatibles con *Bacillus anthracis* Micrografía del CEDIVE. FCV. UNLP.



### **Coloraciones**

Protocolos de las coloraciones más utilizadas en el laboratorio de diagnóstico veterinario.

### **CEDIVE**

Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias. FCV. UNLP.

## **COLORACIÓN DE GRAM**

El violeta de genciana y todos los colorantes derivados de pararosanilina forman con el yodo compuestos coloreados que son fijados por algunas bacterias, que fijan el violeta después de agregado el Lugol; al hacer actuar el alcohol después este no las decolora, en cambio las bacterias que no son capaces de combinarse con el compuesto yodado del violeta, ceden rápidamente el colorante.

Estas sustancias que toman el Gram serían ácidos grasos no saturados, en cambio los ácidos grasos saturados superiores serían los que abandonan con facilidad el colorante.

En el método de Gram se usa un colorante de contraste que es la fuccina o safranina.

Este método ha permitido clasificar a los microorganismos en dos grupos: a) los que fijan el violeta sin decolorarse con el alcohol: bacterias Gram positivas y b) las que ceden el violeta tiñéndose con el colorante de fondo (fuccina o safranina) se llaman Gram negativos.

### **Reactivos:**

- violeta de genciana
- solución de yodo-yodurada (lugol)
- fuccina o safranina
- alcohol de 95°

Estas soluciones vienen preparadas comercialmente listas para su uso (kit para coloración de Gram de Britania).

### Solución de Violeta de Genciana:

Se pulverizan 10 gramos de violeta de genciana para uso bacteriológico, en un mortero; se agrega lentamente, en pequeñas cantidades sucesivas, 100 mL de alcohol etílico de 95°. A continuación se filtra por papel de filtro. Esta es la solución A.



### **Coloraciones**

Protocolos de las coloraciones más utilizadas en el laboratorio de diagnóstico veterinario.

### **CEDIVE**

Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias. FCV. UNLP.

Por otra parte se prepara una solución acuosa de ácido fénico al 5% (solución C), y una solución acuosa de gelatina al 0,2% (solución B).

Ambas se preparan con agua destilada.

La mezcla de las tres soluciones se realiza de la siguiente manera: A 100 mL de la Solución A (violeta de Genciana) se agrega lentamente 400 mL de solución B (solución de gelatina) y se coloca la muestra a 37 ° durante 24 hs en un frasco tapado. A continuación se agregan dosis crecientes de la solución C (Solución de ácido fénico) en la siguiente forma:

1er día .....0,1 mL.

2do día.....0.2 mL.

3er día.....1 mL.

4to día.....2 mL.

5to día.....10 mL.

6to día.....20 mL.

7mo día.....50 mL.

8vo día.....100 mL.

9no día.....100 mL.

10mo día.....Cantidad suficiente para completar 500 mL de solución fenicada agregada.

En resumen las cantidades finales son las siguientes:

Solución de violeta de genciana.....100mL

Solución de gelatina.....400mL

Solución de ácido fénico.....500mL

### Solución de lugol

5 gramos de cristales de yodo

10 gramos de yoduro de K

100 ml de agua destilada

Para su empleo diluir en la proporción: 1:5 en agua destilada.

Conservar al resguardo de la luz en un frasco color caramelo

Desechar cuando el color se aclara.



### Coloraciones

Protocolos de las coloraciones más utilizadas en el laboratorio de diagnóstico veterinario.

### CEDIVE

Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias. FCV. UNLP.

#### Solución de safranina:

Solución madre: 2,5 gramos de safranina o en 700 mL de alcohol etílico de 95°

Solución para empleo inmediato: 10 mL de solución madre en 90 mL de agua destilada.

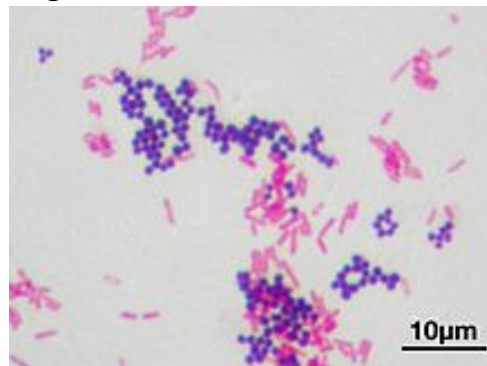
#### **Técnica:**

1. Hacer un extendido fino usando una suspensión de cultivo joven, porque muchas bacterias Gram positivas lo son menos al envejecer. También se pueden hacer improntas de órganos o extendidos de líquidos corporales (LCR, sangre, materia fecal, exudados, secreciones purulentas, etc).
2. Fijar al calor pasando el portaobjetos 3 veces por la llama.
3. Dejar enfriar.
4. Bañar con violeta de Genciana y dejar actuar 1 minuto.
5. Enjuagar con agua corriente.
6. Cubrir con lugol y dejar actuar 1 minuto.
7. Enjuagar con agua corriente.
8. Decolorar con alcohol.
9. Enjuagar con agua corriente.
10. Colorear con el colorante de contraste usando fucsina por 1 minuto, o safranina por 30 segundos.

#### **Interpretación:**

Gram positivos: violeta

Gram negativos: rosados



**Figura 4.** Coloración de Gram (100X) se observan cocos en grupos Gram positivos y bacilos Gram negativos. Micrografía tomada de Internet (Wikipedia).